

MICROBIOLOGIA

Crèdits teoria: 4.5

Crèdits pràctics: 1.5

Objectius:

Aportar als estudiants coneixements fonamentals sobre els microorganismes: tècniques de laboratori, estructura, funció, metabolisme, creixement i control, virologia, genètica, ecologia així com diversitat i aplicacions. Es pretén donar una base sobre la qual puguin desenvolupar-se assignatures més específiques.

Els objectius de la part pràctica pretenen familiaritzar a l'alumne en les tècniques microbiològiques bàsiques.

Avaluació:

L'avaluació de l'assignatura es realitzarà mitjançant un examen test. En la nota final de l'assignatura es té en compte la memòria realitzada de la part pràctica de l'assignatura.

PROGRAMA DE MICROBIOLOGIA

LLICENCIATURA DE QUÍMICA

CURS 1995-96

INTRODUCCIÓ I MÈTODES

Lliçó 1. La ciència microbiològica. El món dels microorganismes

Descobriments dels microorganismes. Evolució històrica de la Microbiologia. Desenvolupaments recents de la Microbiologia. Nivells d'organització. Principals diferències entre virus i organismes cel·lulars. Organització procariòtica. Organització eucariòtica. Grups i denominació dels microorganismes.

Lliçó 2. Tècniques d'observació de microorganismes

Microscòpia òptica: microscòpia de camp clar, de camp fosc, de contrast de fases i de fluorescència. Fixació i tinció. Tincions diferencials: mètode de Gram. Examen de microorganismes *in vivo*. Microscòpia electrònica de transmissió i d'escombratge.

Lliçó 3. Medis de cultiu i tècniques d'esterilització

Requeriments nutritius dels microorganismes. Composició dels medis de cultiu. Cultiu en medi sòlid i en medi líquid. Medis d'enriquiment. Medis selectius i diferencials. Esterilització. Tipus: calor seca i humida. Agents químics. Radiacions. Control de l'esterilització.

Lliçó 4. Aïllament i conservació dels microorganismes

Importància i significat dels cultius axènics. Tècniques d'aïllament de microorganismes aeròbics. Aïllament de microorganismes anaeròbics. Tècniques de conservació. Col·leccions de microorganismes.

ESTRUCTURA I FUNCIÓ

Lliçó 5. El citoplasma bacterià

Membrana citoplasmàtica. Ultraestructura del citoplasma. Ribosomes. El mesosoma. Inclusions funcionals: Vesícules de gas, Clorosomes, Carboxisomes, Magnetosomes. Inclusions de reserva: Glicogen, PHB, Cianoficina, Polifosfat, Sofre.

Lliçó 6. Envoltes cel·lulars

Composició química de la paret. Estructura macromolecular. Diferències entre eubacteris Gram-positius, Gram-negatius i arqueobacteris. Acció d'enzims i antibiòtics en l'estabilitat de la paret cel·lular. Materials extracel·lulars. Càpsula i capes mucoses.

Lliçó 7. Apèndix de la superfície cel·lular. Adhesió i moviment

Proteïnes i fimbries. Flagels: estructura i funció. Distribució dels flagels en la superfície cel·lular. Moviment bacterià. Moviment d'espироquetes i reptació. Tactismes.

Lliçó 8. Divisió cel·lular

Estructura del cromosoma bacterià: proteïnes tipus histones. Material genètic extracromosòmic. Divisió cel·lular. Tipus. Pluricel·lularitat en bacteris.

Lliçó 9. Formes de diferenciació en bacteris

Divisió asimètrica. Espores bacterianes. Tipus. Estructura i funció. Esporulació i germinació. Altres formes d'anabiosi: cists i exospores. Diferenciació morfològica.

METABOLISME BACTERIA

Lliçó 10. Esquema metabòlic global

Fons d'energia, de poder reductor i de carboni. Acceptors d'electrons. Tipus de microorganismes segons el seu comportament fisiològic. Estratègia biosintètica. Precursors metabòlics.

Lliçó 11. Vies degradatives

Degradació de carbohidrats: via d'Entner-Doudoroff, via de les pentoses, via d'Embden-Meyerhof-Parnas; relació entre elles. Degradació d'àcids orgànics, hidrocarburs, compostos aromàtics i aminoàcids.

Lliçó 12. Fermentació

Característiques de la fermentació. Fosforil·lació a nivell de substrat. La fermentació com a reacció d'oxidació-reducció. Reducció del piruvat: productes finals. Fermentació de compostos nitrogenats.

Lliçó 13. Respiració

Sistemes de transport d'electrons. Components de les cadenes respiratòries: flavoproteïnes, quinones, proteïnes de Fe-S i citocroms. Acceptors externs d'electrons. Cadenes respiratòries bacterianes. Reducció assimilatòria i desassimilatòria.

Lliçó 14. Metabolisme quimiolitotròfic

Obtenció d'energia per oxidació de compostos inorgànics. Flux invers d'electrons. Bacteris de l'hidrogen. Oxidadors de compostos de sofre. Bacteris nitrificants. Bacteris del ferro. Metilòtrofs. Paper dels quimiolitòtrofs en el reciclatge dels elements.

Lliçó 15. Metabolisme fototròfic

Fotosíntesi anoxigènica. Bacterioclòrfiles. Carotens. Fotofosforil·lació cíclica. Donadors d'electrons. Diferències entre la fotosíntesi anoxigènica i la oxigènica. Fotosíntesi en cianobacteris. Fons de carboni. Cicles de Calvin i Arnon.

Lliçó 16. Metabolisme del nitrogen

Assimilació del nitrogen. Fixació de nitrogen. Regulació. Organismes fixadors de nitrogen. Fixació lliure i simbiòtica.

CREIXEMENT I CONTROL DELS MICROORGANISMES

Lliçó 17. Creixement bacterià

Creixement cel·lular i creixement poblacional. Mètodes de quantificació del creixement poblacional. Cinètica de creixement. Temps de duplicació. Taxa específica de creixement. Rendiment del substrat.

Lliçó 18. Cultiu continu de microorganismes

Principis bàsics de funcionament d'un cultiu continu. Taxa de dilució. Autoregulació. Tipus de cultiu continu: Quimiostats i turbidostats. Camps d'aplicació.

Lliçó 19. Influència dels factors ambientals sobre el creixement

Temperatura. Activitat hídrica. Potencial redox i pH: modificació per microorganismes. Radiacions. Pressió hidrostàtica.

Lliçó 20. Agents quimioteràpics

Desinfectants i antisèptics. Tipus i mètodes de valoració. Quimioteràpia. Tipus de substàncies utilitzades i acció específica. Concepte d'antibiòtic. Valoració de la seva activitat: CMI. Espectre d'acció. Tipus químics d'antibiòtics. Dianes i mecanismes de resistència als antibiòtics.

VIROLOGIA

Lliçó 21. Morfologia, estructura i composició química dels virus

Descobriments i naturalesa dels virus. Estructura de les partícules víriques. Components químics. Criteris de classificació dels virus. Virus vegetals. Virus animals. Bacteriofags. Viroids i prions.

Lliçó 22. Anàlisi quantitativa de virus

Mètodes d'observació directa: microscòpia elèctronica de partícules víriques. Assaigs d'infectivitat. Enumeració de virus. Característiques generals de les relacions virus-cèl·lula hospedadora

GENETICA BACTERIANA

Lliçó 23. Mutagènesi

Mutacions, selecció de mutants i expressió fenotípica. Tests bacterians de detecció d'agents genotòxics i mutagènics.

Lliçó 24. Plasmidis

Tipus i estructura molecular dels plasmidis. Incompatibilitat entre plasmidis. Caràcters codificats per plasmidis.

Lliçó 25. Mecanismes de transferència gènica

Conjugació. Transformació. Transfecció. Transducció especialitzada i generalitzada. Conversió fàgica.

ECOLOGIA MICROBIANA

Lliçó 26. Els microorganismes en el seu ambient

Ambients terrestres i aquàtics, característiques principals. Concepte de microambient. Colonització de superfícies. Mètodes d'estudi.

Lliçó 27. Relacions tròfiques en microorganismes

Interaccions en una mateixa població. Interaccions entre poblacions de diferents microorganismes. Evolució de la simbiosi. Teoria de l'endosimbiosi seriada. Paper dels microorganismes en les xarxes tròfiques.

Lliçó 28. Acció geoquímica dels microorganismes

Els microorganismes com a agents de canvi geoquímic. Cicle del fòsfor. Cicles del carboni i de l'oxigen. Cicle del nitrogen. Cicle del sofre.

DIVERSITAT I APLICACIONS DELS MICROORGANISMES

Lliçó 29. Sistemàtica bacteriana

Concepte d'espècie. Problemàtica de la sistemàtica bacteriana. Taxonomia morfològica i bioquímica. Taxonomia molecular i genètica. Taxonomia numèrica. Classificacions bacterianes utilitzades. El Manual de Bergey de Bacteriologia Determinativa. El Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemàtica. Filogènia bacteriana.

Lliçó 30. Microbiologia aplicada

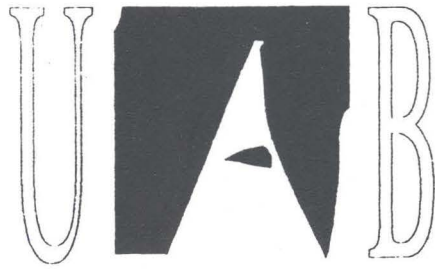
Elaboració de derivats làctics, càrnies i de cereals. Elaboració de begudes alcohòliques. Producció de vinagre. Producció d'antibiòtics. Lixiviació. Biopolímers microbins d'interès industrial. Utilització de residus i bioeliminació de contaminants

BIBLIOGRAFIA

Textos generales

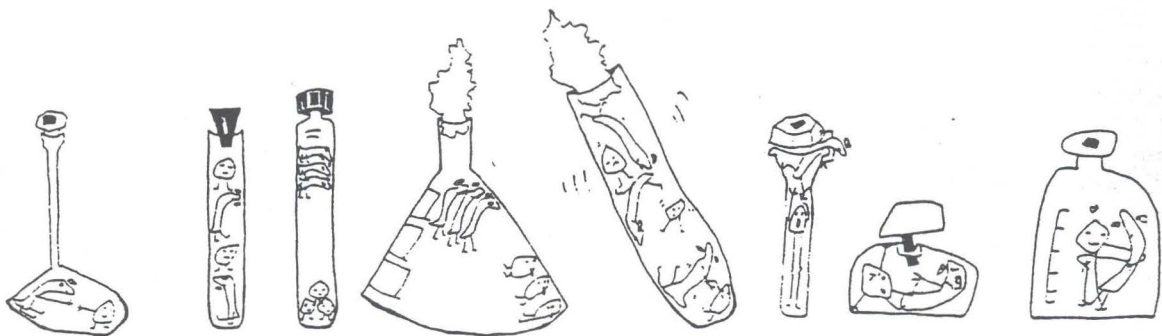
- Brock, T.D. & M.T. Madigan. 1991. Biology of microorganisms (6^a ed.) Prentice-Hall // Biología de los microorganismos. McGraw-Hill (trad. de la 4^a ed.).
- Stanier, R.Y., J.L. Ingraham, M.L. Wheelis & P.R. Painter. 1986. The microbial world (5^a ed.). Prentice-Hall // Microbiologia. Editorial Reverté, 1988 (trad. de la 5^a ed.).
- Davis, B.D., *et al.* 1990. Microbiology (4^a ed.). Lippincott // Tratado de Microbiología. Salvat, 1978 (trad. de la 2^a ed.).
- Tortora, G.J. *et al.* 1989. Microbiology. An Introduction (3^a ed.) Benjamin Cummings Pub. Co ...//...Introducción a la Microbiología, 1993. Editorial Acribia, S.A. (trad. de la 3^a ed.)

Departament de Genètica i de
Microbiologia



Universitat Autònoma de Barcelona

Microbiologia



Unitat de Microbiologia

ÍNDEX

	pag
TÈCNIQUES GENERALS	
Mòdul 1 Material i equipament bàsic	1
Mòdul 2 Tècniques d'esterilització	2
Mòdul 3 Preparació de medis de cultiu	3
PRÀCTIQUES GENERALS	
Mòdul 4 Mètodes de recompte de microorganismes	6
Mòdul 5 Mètodes d'aïllament i de conservació de microorganismes	9
Mòdul 6 Observació de microorganismes. Tincions	11
Mòdul 7 Observació de microorganismes. Motilitat	14
Mòdul 8 Identificació de microorganismes.	15
Mòdul 9 Ubiquïtat i diversitat microbiana	22
Mòdul 10 Creixement poblacional de microorganismes	24
ANNEX	
1. Composició de diferents medis de cultiu	25
2. Composició de diferents colorants	27
Qüestionari de pràctiques	28

Material i equipament bàsic

A. Material de vidre o de plàstic esterilitzable

Tubs d'assaig de diferents mides, plaques de Petri, pipetes graduades, pipetes Pasteur, nanses de Digralski, matraus, erlenmeyers, probetes, ampolles amb tap de rosca, portaobjectes, cubreobjectes, etc.

B. Material divers

Nanses de Kolle, gradetes, cistelles metàl·liques, Bunsens, trípodes, termòmetres, cotó, paper d'embalatge, indicador de pH, etc.

C. Aparells

Balances: És convenient disposar de balances de precisió fins a dècimes de grams i fins a dècimes de miligram.

Microscopis: Microscopi òptic amb objectiu d'immersió.

Refrigeradors: Refrigerador comercial a 4 °C, així com congelador de -20 °C.

Estufes o cambres d'incubació: Estufes o cambres amb temperatura controlada a les temperatures d'incubació més habituals: 20 °C, 30 °C y 37 °C.

Centrifugadores: Centrifugadores petites fins a 5000 rpm i centrifugadores refrigerades d'alta velocitat.

Espectrofotòmetre i la seva utilització: La **terbolesa** d'un brou de cultiu és un bon paràmetre per estimar la biomassa d'una població bacteriana i, per tant, seguir-ne el creixement al llarg del temps. En un espectrofotòmetre, un raig de llum es transmet a través d'una suspensió bacteriana fins arribar a una cèl·lula fotoelèctrica. A mesura que el nombre de bacteris augmenta, el brou es torna més tèrbol, absorbint més llum i per tant arribant-ne menys a la cèl·lula. El canvi de llum és enregistrat a l'aparell com a percentatge de **transmitància** (quantitat de llum que passa a través de la suspensió) i com a **absorbància o densitat òptica** (DO) (valor derivat del percentatge de transmitància).

Mètode	Temps i temperatura	Utilització	Actuació	Desavantatges
Calor seca	1 hora a 170°C	Material de vidre i de metall	Desnaturalització de components cel·lulars	No es pot utilitzar per medis líquids. Alguns plàstics es fonen
Esterilització intermitent (Tindallització)	30 min a 100°C durant 3 dies consecutius	Medis, teixits, líquids, sòlids	Mort dels microorganismes per calor durant els primers 30 min. Les espores germinen i les cèl·lules vegetatives són destruïdes en el cicle següent.	Dura molt de temps
Calor humida (Autoclau)	15 - 30 min a 121°C i una pressió de 15 psi.	Vidre, medis líquids, sòlids, metalls, etc.	Desnaturalització de components cel·lulars	Alguns components del medi no són estables a temperatures elevades
Filtració	Filtres de 0.45 μm ó de 0.22 μm , aparell de buit	Medis líquids	Retenció dels bacteris en el filtre	Tan sols permet esterilitzar medis líquids
Gasos	Òxid d'etilè	Material termosensible	Desnaturalització de components cel·lulars	Molt tòxic, inflamable
Radiació	Ultravioleta (UV) o ionitzant (raigs X o γ)	Medis líquids, sòlids, fàrmacs, material de plàstic d'un sol ús	Mutacions que interfereixen en el metabolisme i causen la seva mort	La radiació UV té poc poder de penetració. Per utilitzar radiació γ cal tenir accés a equipament radiactiu

Preparació de medis de cultiu

Fonament

Els medis de cultiu han de satisfer tots els requeriments nutritius dels microorganismes que es volen estudiar. Ha de contenir fonts de carboni, nitrogen, sofre, fosfor i, en menor quantitat, altres elements com ferro, magnesi, cobalt, manganès, etc., així com una font d'energia i una font de poder reductor. En **medis mínims** o **sintètics**, la composició es coneix exactament i el medi es prepara utilitzant quantitats conegudes de cada un dels constituents. En **medis rics** o **complexes**, s'utilitzen components com extracte de llevat, triptona o peptona que, tot i que tenen una composició heterogènea i indeterminada, contenen tots els elements que el bacteri necessita per desenvoluparse. El medi de cultiu pot ser líquid (en aquest cas es parla de **brou**) o bé estar solidificat amb agar, (en aquest cas es parla de **medi sòlid** o d'agar nutritiu, agar citrat, agar sang, etc.).

Tipus de Medis de cultiu

Els medis de cultiu emprats per cultivar microorganismes es poden dividir en tres grups:

A. Medis de desenvolupament

Normalment contenen totes les substàncies nutritives per a la bona multiplicació dels microorganismes. Són emprats per recomptes i manteniment dels microorganismes. Exemples són el medi LB, l'aigua peptonada, el medi Sabouraud, etc.

B. Medis selectius

Normalment s'utilitzen per aïllar alguns tipus especials de bacteris. Contenen substàncies que favoreixen el desenvolupament del microorganisme que es vol aïllar, al mateix temps que contenen d'altres substàncies que inhibeixen el creixement d'altres tipus de microorganismes. Exemples són l'agar de McConkey i l'agar d'eosina i blau de metilè (EMB) per l'aïllament de coliforms, l'agar Manitol Salt per l'aïllament de *Staphylococcus* o l'agar Wright per l'aïllament de *Rhizobium*.

C. Medis diferencials o determinatius

S'empren per determinar les propietats fisiològiques i bioquímiques dels bacteris. Exemples són l'agar citrat de Simmons o citrat de Koser (utilitzat per determinar si un bacteri pot utilitzar citrat extern com a única font de carboni), el

medi MR-VP (on es determina el tipus de fermentació dels enterobacteris), etc. Alguns medis com el McConkey i el Manitol Salt, abans esmentats, constitueixen exemples de medis que són diferencials i a la vegada selectius.

Mètodes de preparació dels medis de cultiu

Consideracions generals

Actualment, la preparació de medis de cultiu és molt ràpida i senzilla. La majoria de fórmules que defineixen un medi de cultiu són suministrades comercialment per diferents empreses (Difco, BBL, Oxoid, etc.) en forma deshidratada. La preparació només consisteix en dissoldre la quantitat adequada en el volum d'aigua destil·lada que s'indica. En el cas dels medis sòlids, l'agar pot ja estar inclòs en el medi deshidratat, o bé cal afegir-lo. Una vegada preparat, si el medi conté agar cal portar-lo a ebullició fins aconseguir una bona dissolució.

En aquells casos en què els medis no se suministrin comercialment, cal pesar cada un dels seus components i procedir com en el cas anterior. Si el medi porta algun sucre en la seva composició, normalment aquest es prepara dissolt en aigua, s'esterilitza per filtració, i s'addiciona estèrilment després d'haver preparat i esterilitzat la resta dels components.

Preparació de medis sòlids

Els medis sòlids es preparen afegint agar al medi líquid, a una concentració final del 10-20%. L'agar es fon a 95°C, la qual cosa permet cultivar els microorganismes des de temperatures baixes fins a 95°C. A més a més, una vegada líquid no solidifica fins a 40°C. Això permet la preparació de medis de cultiu a temperatura ambient, així com l'addició de microorganismes en l'agar fos per procedir posteriorment a la sembra en placa. L'agar forma un gel consistent i transparent que és utilitzat per molt pocs microorganismes ja que està constituït per barreges complexes de polisacàrids lineals i ramificats. Avui en dia és el medi solidificant més emprat en la preparació de medis de cultiu per microorganismes.

La quantitat d'agar que s'afegeix a un medi per solidificar-lo depèn de:

- el tipus d'agar (casa comercial, grau de puresa, etc.)
- la duresa que es vulgui aconseguir
- la temperatura d'incubació i/o ambient en que s'hagin de manipular els tubs o les plaques.

La quantitat habitual per preparar medis sòlids oscil·la entre 12 i 18 g/l. L'agar s'incorpora al medi, es bull 1 ó 2 min i posteriorment s'esterilitza i s'aboca en plaques o en tubs en la quantitat desitjada.

L'anomenat **agar tou** (utilitzat en la sembra en doble capa) conté entre 5 i 7 g/l d'agar. L'agar s'incorpora al medi, es prepara igual que abans i després d'esterilitzar es distribueix en tubs petits. A l'hora de realitzar la sembra, es liqua prèviament el medi i es manté a una temperatura constant de 45°C. Seguidament, es procedeix a sembrar els microorganismes.

De vegades, en la preparació de certs medis de cultiu es prepara el que s'anomena **agar base**. Consisteix en una dissolució d'agar en aigua sense cap d'altre component. La concentració d'agar pot ser la final o bé més concentrada (2X, 4X, etc.)

pH dels medis de cultiu

Per a un adequat creixement dels microorganismes, els medis de cultiu han de tenir el pH apropiat al tipus de microorganisme que es desitja fer créixer. La majoria de microorganismes es desenvolupen bé a pH neutre (entre 7 i 7.2). Si els components del medi donen lloc a un valor diferent de pH caldrà ajustar-lo amb HCl 0.1 M ó NaOH 0.1 M. L'òptim de pH per d'altres microorganismes com els llevats és àcid, al voltant de 5.5.

Durant la preparació de qualsevol medi de cultiu, cal tenir en compte que en el procés d'esterilització amb l'autoclau, el pH pot disminuir en 0.2 unitats, la qual cosa fa que en la preparació de la majoria de medis de cultiu, s'ajusti el pH a 7.4 abans de procedir a l'esterilització.

Mètodes de recompte

Fonament

El recompte del nombre de microorganismes d'una mostra pot calcular-se, d'una banda, determinant el nombre de microorganismes que creixen en un determinat medi de cultiu desenvolupant colònies visibles (recompte **viable**) i, d'una altra banda, comptant les cèl·lules o agrupacions de cèl·lules que es poden observar en la mostra mitjançant tècniques microscòpiques (recompte **directe** o també anomenat **total**).

Protocol 1. Tècniques de dilució i càlculs

En condicions adients de creixement els bacteris es multipliquen i donen lloc a poblacions tan grans que sovint esdevé necessari diluir-les per tal d'obtenir colònies aïllades que es puguin comptar. Per això és necessari barrejar una petita quantitat de mostra amb un volum d'aigua o bé d'una dissolució salina estèrils (diluent).

Una dilució simple es calcula com segueix:

$$\text{Dilució} = \frac{\text{Volum de mostra}}{\text{Volum total (mostra + diluent)}}$$

Per exemple, la dilució de 1 ml de mostra en 9 ml de diluent equival a:

$$\frac{1}{1+9} = \frac{1}{10} \quad \text{i s'escriu 1:10}$$

L'experiència ens demostra que les dilucions són més exactes si es fan sèries de petites dilucions que fent-ne una de gran. El conjunt d'aquestes dilucions s'anomena **dilució seriada**, i la dilució total és el producte de cadascuna de les dilucions de la sèrie. Per exemple, si diluïm 0.5 ml de mostra en 4.5 ml de diluent, i llavors 0.5 ml d'aquesta primera dilució en 4.5 ml de diluent, la dilució final serà:

$$\frac{0.5}{5} \times \frac{0.5}{5} = \frac{1}{100} \quad \text{ó} \quad 1:100$$

Per facilitar els càlculs, la dilució s'escriu utilitzant notació exponencial. En l'exemple donat, la dilució final **1:100** s'escriurà **10^{-2}** ó també **-2**.

Per fer una dilució seriada, cal procedir com s'indica a continuació:

- Pipetejar en condicions estèrils la mostra en el tub de diluent.
- Barregeu-ne els continguts agitant lleugerament el tub.
- Repetiu el procés de forma seriada tantes vegades com sigui necessari fins a tenir en 0.1 ml de l'última dilució un nombre de bacteris adequat (obviament aquesta estimació és pressumptiva).
- De les últimes dilucions realitzades se sembra 0.1 ml sobre la placa (extenent amb la nansa de Digralsky) o bé se sembra en un tub d'agar tou (i s'aboca a la placa).
- Les plaques es posen a incubar a la temperatura òptima i un cop passat el temps necessari es fa un recompte del nombre de colònies, utilitzant aquelles plaques que tinguin entre 30 i 300 colònies.
- Els resultats s'expressen en **unitats formadores de colònies per mililitre** (cfu/ml) segons la següent fórmula:

$\text{cfu / ml} = \frac{\text{Núm. colònies}}{\text{dilució acumulada} \times \text{volum sembrat}}$

Protocol 2. Recompte directe (mètode de Breed)

- S'agafa un portaobjectes, es neteja amb etanol per treure'n el greix que pugui tenir i es deixa assecar.
- S'hi dibuixa un quadrat d'1 cm de costat, amb un retolador que escrigui sobre vidre.
- Es dóna la volta al porta i s'ha d'observar una superfície ben delimitada d'1cm².
- Amb una micropipeta s'extén 0.01 ml de la mostra, prèviament homogenitzada, sobre el quadrat.
- S'asseca immediatament, es fixa per calor suaument i es cobreix l'extensió amb blau de metilè durant 1 minut.
- Es renta amb aigua, s'asseca sense fixar a la flama i s'examina a través del microscopi.

- A continuació es compta el nombre de microorganismes en diferents camps. En el recompte de mostres molt diluïdes en les quals el nombre de cèl.lules per camp és molt petit, cal comptar un nombre de camps més elevat. Si les cèl.lules estan homogèniament repartides es pot aplicar la següent taula:

Nº de bacteris / camp	Nº de camps que s'han de comptar
0 - 3	64
4 - 6	32
7 - 12	16
13 - 25	8
26 - 50	4
51 - 100	2
> 100	1

- Si la distribució no és homogènia s'han de comptar un mínim de 10 camps i en total com a mínim 300 cèl.lules.
- Es fan els següents càlculs:

$$n^{\circ} \text{ cèl.lules / ml} = \frac{(\text{mitjana cèl./camp}) \times n^{\circ} \text{ camps}}{\text{volum (ml)}}$$

$$n^{\circ} \text{ camps} = \frac{1 \text{ cm}^2}{\pi r^2}$$

r = radi del camp del microscopi = $90 \mu\text{m}$

Mètodes d'aïllament i de conservació de microorganismes

AÏLLAMENT DE MICROORGANISMES

Fonament

L'aïllament de microorganismes consisteix en la separació en medi sòlid de dos o més microorganismes que es troben junts en una determinada mostra, amb l'objectiu d'aconseguir colònies separades i poder obtenir cultius purs.

Per aïllar microorganismes es poden emprar diferents procediments, com els que s'esmenten a continuació.

Protocol 1. Aïllament per dilució

L'aïllament per dilució es basa en l'extenxió per la superfície d'una placa d'agar d'un nombre de microorganismes prou petit com perquè al créixer, cada un d'ells doni lloc a una colònia ben aïllada. Per aconseguir que el nombre d'organismes que s'inocula sigui prou baix es fan dilucions de la suspensió original.

- Es prepara una sèrie de dilucions utilitzant solució salina (NaCl 0.9%) (Ringer 1/4) (vegeu Mòdul 4)
- Se sembra 0.1 ml de les dues últimes dilucions en la superfície d'una placa, realitzant una extensió homogènia amb la nansa de Digralsky.
- S'incuben les plaques a la temperatura adequada.
- Una vegada han crescut els bacteris, s'han d'observar colònies aïllades per tal de poder distingir clarament les seves característiques i procedir a l'obtenció de cultius purs.
- Utilitzant aquest procediment es pot fer també un recompte de viables per a cada morfologia colonial observada, fent els càlculs segons s'ha indicat en el Mòdul 4.

Protocol 2. Aïllament per esgotament en placa

- Des d'una suspensió de microorganismes o des d'una colònia, s'agafa una mostra amb la nansa de Kolle.

- Se sembra per estria en ziga-zaga fins "esgotar la nansa" sobre una o dues plaques de medi sòlid.
- S'incuben les plaques a la temperatura adequada. Una vegada han crescut els bacteris, s'han d'observar colònies aïllades, procedint igual que en el protocol 1.

CONSERVACIÓ DE MICROORGANISMES

El mètode més convenient per mantenir els cultius purs en condicions viables, depèn de les característiques de cada microorganisme i s'ha d'escollir d'acord amb elles.

Conservació en medis sòlids

Molts microorganismes poden mantenir-se en agar inclinat, plaques d'agar, o vials sembrats per picadura. Un cop incubats dins una estufa es guarden a la nevera, però s'han de resembrar cada 1 ó 2 mesos. Si es volen conservar durant un període de temps superior es poden sembrar per picadura i cobrir la superfície amb parafina líquida. D'aquesta manera es poden mantenir més temps (6-12 mesos), sense resembrar-los.

Liofilització

En aquest procés els cultius (deshidratats per la liofilització) es conserven en ampolles tancades al buit. Les ampolles es poden guardar a la nevera o bé a temperatura ambient i els cultius poden arribar a conservar-se més de 30 anys.

Congelació

Aquest procediment, força utilitzat per a la conservació de microorganismes, consisteix en la congelació dels cultius a -20, -80 (en congeladors) ó -196°C (nitrogen líquid) després d'haver-hi afegit un agent crioprotector com glicerol o dimetilsulfòxid (DMSO). Per aquest procediment els cultius poden conservar-se durant alguns anys.

Observació de microorganismes

Tincions

Fonament

Quan s'observa un microorganisme al microscopi es veu sense color i és difícil apreciar la seva morfologia, tamany i a vegades agrupació. Per aixó cal utilitzar tincions que posin de manifest les característiques dels microorganismes i, en cassos adients, facin visibles determinades estructures.

La **tinció simple** més corrent és la tinció amb blau de metilè, amb la qual es pot determinar ràpidament la forma, el tamany i l'agrupació dels bacteris més comuns.

La **tinció diferencial** més utilitzada és la tinció de Gram. És una tinció diferencial perquè els bacteris poden presentar dues coloracions (blava o vermella) depenent de la diferent composició i estructura de la seva paret. A més a més, existeixen diferències fisiològiques entre els bacteris segons la tinció de Gram que presentin. Els bacteris Gram-positius són més resistents a l'acció d'enzims proteolítics, agents oxidants, etc., que els bacteris Gram-negatius. D'altra banda, són més sensibles als àcids, detergents, sulfamides i antibiòtics com la penicil·lina o actinomicina A. Un altre exemple de tinció diferencial es la tinció de Ziehl-Neelsen que permet diferenciar bacils àcid resistents.

Finalment, estructures com els flagels, endospores, càpsules, grànuls metacromàtics (polifosfat) i inclusions de PHB, que no són visibles amb les tincions simples, poden posar-se de manifest amb **tincions específiques**.

Les tècniques de tinció més habituals s'apliquen a frotis de mostres prèviament fixades a la flama. El frotis es prepara extenent la suspensió de bacteris per la superfície del portaobjectes de forma que al fixar-la per escalfament a la flama acabi formant una pel·lícula fina i homogènia.

Mètodes de Tinció

Protocol 1. Tinció simple

- Prepareu un frotis i fixeu a la flama.
- Tenyiu durant 1 min amb blau de metilè.
- Renteu amb aigua.
- Assequeu i observeu.

Protocol 2. Tinció de Gram

- Feu un frotis i fixeiu-lo a la flama.
- Tenyiu amb cristall violat durant 1 minut.
- Renteu amb aigua i deixeu-lo escórrer.
- Afegiu lugol durant 1 minut.
- Renteu amb aigua.
- Decoloreu amb alcohol.
- Tenyiu amb safranina alcoholica durant 1-2 minuts.
- Els bacteris Gram-positius es tenyeixen de color blau, per exemple *Staphylococcus* sp. Els bacteris Gram-negatius es tenyeixen de vermell, per exemple *Escherichia coli*.

Protocol 3. Tinció d'espores

- Prepareu un frotis i fixeiu-lo a la flama.
- Cobriu el frotis amb verd de malaquita i manteniu-lo directament sobre l'encenedor Bunsen, de manera que el colorant s'evapori. Aneu afegint colorant durant 10 minuts.
- Renteu amb aigua.
- Tenyiu amb safranina aquosa durant 1 minut.
- Renteu amb aigua i assequeu.
- Observeu al microscopi amb oli d'immersió.
- Les espores es tenyeixen de color verd i la resta de la cèl.lula de color vermell.

Protocol 4. Observació de càpsules

- D'un cultiu de microorganismes s'agafa una petita quantitat amb una pipeta Pasteur i es diposita sobre un portaobjectes.
- Es barreja amb una quantitat igual de tinta xinesa.
- Es fa una extensió amb un altre portaobjectes i es deixa assecar.
- Es tenyeix amb safranina aquosa durant 1 minut.
- Es renta amb aigua i es deixa assecar.
- Observeu la mostra amb el microscopi.
- Les càpsules es veuen com zones no tenyides entre la cèl.lula, de color vermell, i la tinta que l'envolta

Protocol 5. Tinció àcid-resistent (Ziehl-Nielsen)

- Reactius:
 - A. Solució alcohol-àcida: 3 ml d'HCl en 100 ml d'etanol al 95%.
 - B. Fucsina fenicada:
 - Solució 1: 0.3 mg de fucsina bàsica en 10 ml d'etanol
 - Solució 2: 5 g de fenol en 95 ml d'aigua destil.lada
 - Barregeu les solucions 1 i 2
- Prepareu un frotis i fixeiu-lo a la flama.
- Cobriu el frotis amb el colorant de fucsina fenicada i col·loqueu-lo sobre un recipient amb aigua bullint durant 5 minuts.
- Quan el portaobjectes estigui fred, decoloreu amb la solució alcohol-àcida durant 15-20 segons.
- Renteu amb aigua.
- Tenyiu amb blau de metilè durant 30 segons.
- Renteu amb aigua i assequeu.
- Observeu al microscopi amb oli d'immersió.
- Els bacteris àcid-resistents apareixen vermells mentre que els altres es tenyeixen de blau.

Protocol 6. Tinció de poli- β -hidroxibutirat (PHB)

- Prepareu un frotis i fixeiu a la flama.
- Cubriu la preparació amb solució Negre Sudan B i tenyiu-la durant 5-10 min.
- Decanteu i assequeu-la.
- Cubriu-la amb xilol gota a gota.
- Assequeu-la.
- Tenyiu amb safranina aquosa al 0.5 % de 5 a 10 s.
- Renteu, assequeu i observeu.
- Les inclusions de PHB apareixen com partícules de color negre a l'interior de la cel.lula.

Observació de microorganismes

Motilitat

Protocol 1. Mètode directe: Tècnica de la gota pendent

- S'agafa una petita quantitat d'un cultiu de microorganismes amb una pipeta Pasteur i es diposita sobre un cubreobjectes (si el medi és líquid es col·loca directament i si és sòlid s'homogenitza prèviament una colònia en aigua destil·lada o sèrum fisiològic).
- Poseu vaselina sòlida sobre els quatre costats del cubreobjectes.
- Col·loqueu el portaobjectes excavat sobre el cubreobjectes i pressioneu suaument.
- Doneu la volta al portaobjectes i observeu que la gota de cultiu penja sobre la concavitat del portaobjectes. Observeu al microscopi.

Protocol 2. Mètode indirecte

El moviment dels bacteris es manifesta quan es desplacen dins la massa semi-sòlida, on es troben creixent.

Medi de cultiu

- Agar nutritiu tou (5g d'agar per litre)
- Es distribueix en tubs, als quals se'ls ha col·locat, a l'interior, un tub de Craigie, que ha de quedar descobert fins la meitat. Per observar millor el desplaçament del microorganisme, s'afegeix al medi de cultiu 100 µg/ml de TTA (trifeniltetrazoli), el qual, degut a l'activitat de les deshidrogenases del microorganisme, es redueix a "formazán", de color vermell i insoluble en aigua.

Sembra

- Sembreu lleugerament per picadura a l'interior del tub de Craigie. Incubeu a la temperatura òptima del bacteri i observeu diàriament fins uns 10 dies.

Lectura

- Si el microorganisme és mòbil, es mourà pel tub de Craigie fins arribar a l'exterior del tub i situar-se en la superfície, on proliferarà. Si s'afegeix TTA, es podrà observar el desplaçament clarament, ja que a mesura que creix i avança, el medi vira a vermell.
- S'han d'evitar els moviments bruscs del tub, car poden provocar falsos desplaçaments.
- El temps que triguen els bacteris en realitzar el recorregut difereix molt entre uns i altres.

Identificació de microorganismes

1. Caràcters emprats en la identificació de microorganismes

Hi ha gran diversitat de proves que s'han utilitzat en la caracterització i identificació dels bacteris. La reproductibilitat d'una prova, el resultat d'estudiar una determinada característica, és fonamental per a la identificació dels microorganismes. Per aquesta raó és necessari l'estandarització del mètode i la utilització de soques de control, que pertanyin a col·leccions de cultius de referència, i permetin l'obtenció de resultats positius o negatius coneguts.

Les característiques que s'utilitzen a l'hora de fer una identificació de bacteris corresponen a una sèrie de trets que tenen les cèl·lules bacterianes, els quals es poden classificar en sis grans grups.

Morfologia cel·lular. Inclou els aspectes morfològics de les soques, considerades les cèl·lules individualment. Les tècniques utilitzades es basen principalment en l'observació microscòpica i en la utilització de tincions específiques.

Caràcters culturals. Inclou les característiques de cultiu de les poblacions clonals en diferents medis de cultiu.

Caràcters fisiològics. Inclou l'estudi de la capacitat dels microorganismes per desenvolupar-se en diferents condicions ambientals.

Caràcters bioquímics. Inclou les característiques que es podrien considerar com "proves bioquímiques clàssiques". Aquest grup s'ha subdividit en cinc subgrups, que corresponen respectivament a:

1. Detecció d'enzims respiratoris o substàncies estretament relacionades amb ells.
2. Metabolisme de sucres i compostos relacionats, atenent principalment a la producció d'àcid i gas.
3. Metabolisme de compostos nitrogenats de baix pes molecular.
4. Presència d'enzims que puguin degradar grans molècules.
5. Proves que no es poden incloure en cap dels apartats anteriors.

Sensibilitat a substàncies diverses. Inclou la resposta dels microorganismes respecte a diferents substàncies inhibidores del creixement.

Utilització de substàncies orgàniques diverses com única font de carboni i energia. Inclou la possibilitat, per part dels microorganismes, d'incorporar i metabolitzar diferents molècules orgàniques com a fonts de carboni i energia, els quals són utilitzats per separat dins d'un medi mineral.

Degut a la impossibilitat material d'incloure en aquest mòdul totes les proves d'identificació que es poden emprar, a continuació se n'exposa una selecció.

1. Morfologia cel.lular

Forma, tamany i agrupació
Tinció de Gram
Motilitat
Flagelació
Formació d'endospores
Presència d'inclusions citoplasmàtiques (lípid, polifosfats, substàncies paracristal·lines, etc...)

2. Caràcters culturals

Tamany i forma colonial
Creixement en medi líquid
Producció de pigments

3. Caràcters fisiològics

Temperatura òptima
pH òptim
Salinitat òptima
Creixement en anaerobiosi

4. Caràcters bioquímics

4.1. Enzims respiratoris:

Oxidasa
Catalasa
Reducció de nitrats a nitrits

4.2. Metabolisme glúcids i compostos relacionats

Prova de l'oxidació/fermentació
Roig de metil
Voges-Proskauer
Producció d'àcid i gas a partir de glúcids i compostos relacionats

4.3. Metabolisme de compostos nitrogenats

Indol
Sulfur d'hidrogen
Urea
Fenilamina desaminasa
Lisina descarboxilasa
Ornitina descarboxilasa

Arginina dihidrolasa
4.4. Enzims de degradació de macromolècules

Amilasa
Fosfolipases
Lipases
Proteases
Desoxirribonucleases

4.5. Altres proves
 β -galactosidasa
Citrats
Fosfatases
Coagulasa

5. Sensibilitat a diferents substàncies

Lisozim
Antibioticsntibiòtics

6. Utilització de substàncies orgàniques diverses com a única font de carboni i energia.

Glúcids
Àcids
Alcohols i glicols
Aminoàcids alifàtics
Compostos cíclics

Segons les característiques dels microorganismes problema respecte a la morfologia cel·lular, als caràcters culturals i a la procedència de la mostra s'utilitzen unes o d'altres de les proves esmentades amb la finalitat de poder-los identificar emprant proves excloents.

2. Descripció d'algunes proves bioquímiques utilitzades en la identificació

a) Presència d'oxidasa

La prova es basa en comprovar l'existència d'oxidasa bacteriana quan es posen en contacte els bacteris amb un reactiu fàcilment oxidable, el qual adquireix una coloració típica.

Material

- Tetrametil-p-fenilèn diamida en solució aquosa a l'1%.
- El reactiu, una vegada preparat, no té color o és lleugerament rosat. Degut a la seva capacitat d'autooxidació s'ha de guardar a 4 °C i preservar de la llum.

Procediment

- Agafeu una colònia amb la nansa de Kolle i col·loqueu-la damunt de paper de filtre.

- Seguidament, deixeu caure unes gotes del reactiu sobre la superfície de la colònia.

Lectura

- Els bacteris productors d'oxidasa oxiden ràpidament el reactiu i la colònia es torna de color púrpura (durant els primers 60 segons).
- Les colònies negatives no varien de color.

b) Presència de catalasa

La catalasa (peròxid d'hidrogen-peròxid d'hidrogen òxidreductasa) catalitza la descomposició del peròxid d'hidrogen en aigua i oxigen molecular. Quan un organisme que presenta aquest enzim es barreja amb H_2O_2 , s'allibera oxigen.

Aquesta prova s'utilitza per diferenciar els organismes anaerobis estrictes i aerotolerants, que no tenen l'enzim, dels aerobis estrictes o anaerobis facultatius, que el presenten per evitar els efectes tòxics secundaris derivats del metabolisme de l'oxigen.

Procediment

- Prepareu un portaobjectes net.
- Diposeu amb una pipeta estèril una gota de la suspensió microbiana en el centre del portaobjectes.
- Afegiu amb una pipeta una gota d'aigua oxigenada diluïda 1/3.

Lectura

- Si la reacció és positiva es produeix immediatament una gran quantitat de bombolles al desprendre's O_2 .

c) Prova d'oxidació-fermentació de sucres (test O/F)

La prova consisteix en demostrar les dues vies degradatives de sucres amb producció d'àcid pels microorganismes. Per això es preparen dos tubs d'assaig amb el mateix medi de cultiu. L'única diferència consisteix en que en un dels tubs es permet l'accés d'oxigen (tub obert), mentre que en l'altre s'estableixen condicions anaeròbiques (tub tancat). Els microorganismes oxidatius només proliferaran en el tub obert, mentre que els que a més són fermentatius ho faran en els dos tubs. Els microorganismes que no es desenvolupin en cap dels dos tubs seran aquells que presenten un metabolisme de sucres molt poc actiu.

Medi de cultiu

Peptona	2.0	g
Na Cl	5.0	g
Fosfat dipotàsic	0.3	g
Agar	2.5	g

Blau de bromotimol 0.03 g

Disoldre els components en 1000 ml d'aigua destil·lada i portar-ho a ebullició. Esterilitzar amb l'autoclau. Deixar refredar fins a 50°C i afegir glucosa al 1% final (prèviament esterilitzada per filtració). Distribuir 4-5 ml en tubs de diàmetre no superior a 16 mm. Afegir 1 cm de vaselina líquida a la meitat dels tubs una vegada el medi ha solidificat. El medi fred ha de ser de color blau-verd.

Sembra

S'inocula el microorganisme per picadura profunda. S'incuba a la temperatura òptima i s'observa diàriament el resultat des d'1 a 14 dies d'incubació.

Lectura

Es considera un resultat positiu l'aparició de color groc. El canvi de color de l'indicador de verd a groc es produeix a un pH de 6. El canvi a color blau indica l'alcalinització del medi (pH superior o igual a 7.6).

<u>Metabolisme</u>	<u>Tub d'oxidació</u>	<u>Tub de fermentació</u>
Aerobi	groc	verd
Anaerobi	verd	groc
Facultatiu	groc	groc
Inactiu	verd	verd

Alguns microorganismes en presència d'oxigen utilitzen la glucosa oxidant-la fins a aigua i CO₂. En aquests casos no acidifiquen el medi.

d) Prova de la coagulasa

Material

Per a la realització d'aquesta prova es disposarà de:

- **Reactiu pel test de la coagulasa:** eritròcits de marrà sensibilitzats amb fibrinogen.
- **Reactiu control:** eritròcits de marrà no sensibilitzats.
- Per a dur a terme les reaccions es disposarà d'un suports anomenats "cercle pel test" i "cercle pel control".

Procediment

- Agiteu els reactius fins aconseguir una bona homogenització.
- Amb una nansa de Kolle, escampeu amb compte les mostres de microorganismes a provar en el cercle pel test i també en el cercle pel control.
- Afegiu 1 gota del reactiu pel test en el cercle adequat i un altre gota del reactiu control en el seu cercle.
- Barregeu bé amb la nansa de Kolle la gota del reactiu test amb el microorganisme en el cercle del test.

- Escalfeu a la flama la nansa de Kolle i després de refredar barregeu els components del cercle control.

Lectura

- Observeu si hi ha aglutinació mentre heu procedit a barrejar el microorganisme amb els reactius.

e) Mètodes miniaturitzats: Mètode API 20E

El mètode API 20E conté 20 microtubs amb substrats deshidratats. S'inoculen amb una suspensió bacteriana que reconstitueix el medi. Durant la incubació el metabolisme del microorganisme produeix determinats canvis de color ja siguin espontànis o bé per l'addició de diferents reactius.

Procediment

- En la següent taula s'indiquen les proves així com els substrats i les reaccions i/o enzims que es detectaran:

TEST	SUBSTRAT	REACCIONS/ENZIMS
ONPG	orto-nitro-fenil-galactòsid	β -galactosidasa
ADH	arginina	arginina dehidrolasa
LDC	lisina	lisina descarboxilasa
ODC	ornitina	ornitina descarboxilasa
CIT	citrat de sodi	utilització del citrat
H ₂ S	tiosulfat de sodi	producció de H ₂ S
URE	urea	ureasa
TDA	triptòfan	triptòfan desaminasa
IND	triptòfan	producció d'indol
VP	piruvat de sodi	producció d'acetoina
GEL	gelatina de Kohn	gelatinasa
GLU	glucosa	fermentació/oxidació
MAN	manitol	fermentació/oxidació
INO	inositol	fermentació/oxidació
SOR	sorbitol	fermentació/oxidació
RHA	ramnosa	fermentació/oxidació
SAC	sacarosa	fermentació/oxidació
MEL	melibiosa	fermentació/oxidació
AMY	amigdalina	fermentació/oxidació
ARA	arabinosa	fermentació/oxidació
OX	damunt de paper de filtre	citocrom oxidasa
NO ₃ ⁻	tub GLU	producció de NO ₂ ⁻
NO ₂ ⁻	tub GLU	reducció a N ₂

- Prepareu una caixa d'incubació i distribuïu 5 ml d'aigua en els pous per aconseguir un ambient humí.
- Amb la nansa de Kolle inoculeu amb el microorganisme problema 5 ml de solució salina i agiteu fins aconseguir una bona homogenització.
- Amb una pipeta estèril inoculeu amb la suspensió preparada anteriorment els tubs i la cúpula dels tests: CIT, VP i GEL.

- Inoculeu només el tub dels altres tests.
- Cal aconseguir un ambient anaeròbic en els tubs: ADH, LDC, ODC, URE i H₂S. Per això, cubriu amb una gota de parafina líquida.
- Tapeu la caixa i incubeu de 18 a 24 hores a 35-37 °C.

Lectura

- Després de 24 h d'incubació es procedeix a la lectura dels resultats segons està indicat en la taula al final d'aquest punt.
- En alguns casos, per visualitzar les reaccions cal afegir diferents reactius als tubs test:
 - VP: Afegiu 1 gota de VP1 i VP2. Espereu un mínim de 10 min per observar el canvi de color.
 - TDA: Afegiu 1 gota de reactiu TDA.
 - IND: Afegiu una gota de reactiu IND.
 - NO₂⁻: Afegiu 1 gota de reactiu NIT1 i un altre de NIT2 en el tub GLU. Esperar de 2 a 3 min. Si la lectura és negativa, afegiu de 2 a 3 mg de Zn en la cúpula del tub GLU. Espereu uns 5 min.
- Anoteu els resultats negatius o positius segons la taula adjunta

Nota. Si el tub GLU és negatiu i el nombre de tubs positius és igual o inferior a 2 **no afegir cap reactiu, incubar 24 h més.**

Ubiquitat i diversitat microbiana

Els microorganismes es troben arreu. Se'n troben al sòl, a l'aire, a l'aigua, a la pols, sobre superfícies, etc. D'ací es dedueix la importància que té el fet de treballar sota condicions d'esterilitat en un laboratori de Microbiologia.

Aquesta pràctica té com a objectiu mostrar la ubiquitat i facilitat de propagació dels microorganismes, així com la seva diversitat.

PROTOCOL 1

Material

- Plaques de Petri estèrils amb agar nutritiu.
- Pals amb cotó estèril.
- Colorants
- Microscopi
- Estufa a 37 °C
- Aigua destil·lada estèril

Procediment

- Cada grup pot sotmetre la placa a condicions diferents. Com exemple:
 - Es deixa 30 minuts destapada, en contacte amb l'aire del laboratori, o a la finestra.
 - Es realitza un estornut sobre la placa exposada.
 - Es tus sobre una placa oberta.
 - Es toca la superfície de la placa amb la punta dels dits.
 - Es passa un cotó estèril, prèviament humitejat amb aigua destil·lada estèril, sobre una superfície i posteriorment es posa en contacte amb la placa d'agar.
 - Es posa una moneda en contacte amb la superfície de l'agar durant un instant.

Lectura

- Incubeu les plaques a 30 °C durant 24 - 48 h.
- Després del període d'incubació, examineu les plaques, describiu les morfologies colonials i realitzeu tincions de Gram de les diferents colònies que observeu.

PROTOCOL 2

Material

- Mostres d'aigua de diferent procedència
- Nòduls de lleguminoses
- Mostres d'aliments com iogurt, llet, formatge, etc.
- Columnes de Winogradsky
- Tapets microbians

Procediment

- Cada alumne ha d'observar un mínim de 8 mostres diferents.
- Feu preparacions microscòpiques per observació directa o per tinció prèvia segons considereu més adequat.
- L'observació microscòpica pot fer-se a diferents augments per visualitzar els diferents grups de microorganismes (algues, protozous, fongs i bacteris).

Creixement poblacional de microorganismes

Fonament

El creixement d'una població microbiana es mesura seguint l'increment del número de cèl.lules. La velocitat de multiplicació varia d'una espècie a una altra i depèn de les condicions de cultiu (nutrients, temperatura, pH, etc.).

Hi ha diversos mètodes per seguir el creixement d'una població de microorganismes:

- a. recompte de viables.
- b. recompte directe de cèl.lules.
- c. mesura de la terbolesa del cultiu (sempre que siguin suspensions homogènies).

Corba de creixement per mesura de la terbolesa

- Inocular un matrau Monod que conté 10 ml de brou nutritiu amb un cultiu que hagi crescut durant la nit (cultiu overnight ó o/n), obtenint una absorbància de 0.03 a una longitud d'ona de 450 nm.
- Aquesta mesura d'absorbància correspon a temps=0. A partir d'aquest moment prendrem mesures cada 30 minuts.
- Representar els resultats en paper semilogarítmic, col·locant en abscisses el temps i en ordenades les absorbàncies obtingudes.
- Calcular la taxa específica de creixement (μ) i el temps de duplicació (T_d) a partir de les dades representades en la gràfica.

ANNEX

1. COMPOSICIÓ DE DIFERENTS MEDIS DE CULTIU

Agar MacConkey

Peptona	17.0	g
Polipectona	3.0	g
Lactosa	10.0	g
Sals biliars	1.5	g
NaCl	5.0	g
Roig neutre	0.03	g
Cristall violeta	0.001	g
Agar-agar	13.5	g
Aigua destil.lada	1000	ml

Ajustar el pH a 7.1. Bullir fins disoldre l'agar. Esterilitzar a 121°C durant 15 min. Refredar fins a 55°C i repartir en plaques de Petri.

Agar Manitol Salt

Extracte de carn	1.0	g
Peptona	10.0	g
NaCl	75.0	g
Manitol	10.0	g
Roig Fenol	0.025	g
Agar	15.0	g
Aigua destil.lada	1000	ml.

Ajustar el pH a 7.4. Bullir fins dissoldre l'agar. Esterilitzar a 121°C 15 min. Refredar fins a 55°C i repartir en plaques de Petri.

Medi LB

Triptona	10	g
Extracte de llevat	5	g
NaCl	10	g
Aigua destil.lada	1000	ml

L'agar LB es prepara idènticament, afegint 15 g de'agar-agar per litre. Ajustar el pH a 7.2. Esterilitzar a 121°C durant 15 min.

Medi Mínim ABDissolució A:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	20.0	g
Na_2HPO_4	60.0	g
KH_2PO_4	30.0	g
NaCl	30.0	g
Na_2SO_4	0.11	g
Aigua destil.lada	1000	ml

Dissolució B:

$\text{Mg Cl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	16.0 g en 500 ml de H_2O destil.lada
Ca Cl_2	0.44 g en 250 ml de H_2O destil.lada
$\text{Fe Cl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.032 g en 250 ml de H_2O destil.lada

El medi es prepara esterilizant 875 ml d' H_2O destil.lada (i 15 g d'agar si es vol obtenir sòlid). Seguidament s'afegeixen 100 ml de dissolució A estèril + 25 ml de dissolució B estèril + glucosa estèril fins a una concentració final del 0.2%.

2. COMPOSICIÓ DE DIFERENTS COLORANTS

Cristall violat

- Dissolució A

Cristall violat	2	g
Alcohol etílic	20	ml

- Dissolució B

oxalat amònic	0.8	g
Aigua destil.lada	80	ml

- Barrejar les dues dissolucions

Lugol

Aigua destil.lada	2	ml
-------------------	---	----

Iodur potàssic	2	g
----------------	---	---

- Una vegada està dissolt, s'afegeix aigua destil.lada fins a 300 ml.

Safranina alcohòlica

Safranina al 2.5 % en dissolució alcohòlica	10	ml
---	----	----

Aigua destil.lada	100	ml
-------------------	-----	----

Safranina aquosa

- Solució aquosa al 0.25 %

Blau de metilè

Blau de metilè	0.3	g
----------------	-----	---

Alcohol	30	ml
---------	----	----

Aigua destil.lada	100	ml
-------------------	-----	----

Verd de malaquita

- Dissolució aquosa saturada al 7.6 %

Negre Sudan B

- 0.3 g en 100 ml d'alcohol etílic al 70 %

QÜESTIONARI DE PRÀCTIQUES

DE MICROBIOLOGIA

Nom de l'alumne: _____

Assignatura: _____

Grup de Pràctiques: _____

Data: _____

PRÀCTICA N° 1: RECOMPTES MICROBIANS

Microorganisme utilitzat: _____

Protocol 1. Recompte de viables

Fes un esquema del banc de dilució i de les sembres que has realitzat:

Calcula el n° de vials per ml (cfu/ml):

Expressa en la següent taula els resultats que has obtingut:

Dilució					
Nombre de colònies					
cfu/ml					

Protocol 2. Recompte de Breed

Expressa en la següent taula els resultats que has obtingut:

Camp n°	N° de cèl.lules	Camp n°	N° de cèl.lules
Mitjana			
Desviació estàndard			

Calcula el n° de cèl.lules per ml que has obtingut

Omple la següent taula resum:

Grup	Breed	Viables	Grup	Breed	Viables
1			9		
2			10		
3			11		
4			12		
5			13		
6			14		
7			15		
8			16		
Mitjana					
Desviació estandard					

Hi ha diferències entre ambdòs tipus de recomptes? Per què?

PRÀCTICA Nº 2: TINCIONS

1. TINCIO SIMPLE

Microorganisme			
Dibuixa el que veus a 100x			

Microorganisme			
Morfologia Organització de les cèl.lules			

Quin valor té la tinció simple?

Poden fer-se servir d'altres colorants ?

Què passa si no es fixa amb calor la mostra?

i si s'aplica calor excessiu?

2. TINCIÓ DE GRAM

Microorganisme			
Dibuixa el que veus a 100x			

Microorganisme			
Morfologia			
Organització			
Gram			

Quin valor té la tinció Gram?

Si fas una tinció de Gram de cèl.lules eucariotes, quin resultat obtindràs?
Creus que és significatiu?

Es important si la tinció es fa d'un cultiu vell o d'un de jove?

Fes un llistat dels diferents passos en una tinció de Gram per ordre (sense tenir en compte els rentats) i digues quin color tenen les cèl.lules després de cada un si el considerem Gram positiu o Gram negatiu:

Procés	Producte químic	Gram-positiu	Gram-negatiu
1			
2			
3			
4			

Poden eliminar-se alguns passos de la tinció sense que variï el resultat?.
Quins i per què?

3. TINCIÓ D'ESPORES

Microorganisme		
Dibuixa el que veus a 100x		
Posició de l'espore		

Microorganisme		
Dibuixa el que veus a 100x		
Posició de l'espore		

Per què fem una tinció específica d'espores si per d'altres mètodes microscòpics es poden visualitzar?

Quina importància té la posició de l'espore en Microbiologia?

Quin és el fonament físico-químic d'aquesta tinció?

4. OBSERVACIÓ DE CÀPSULES

Microorganisme			
Dibuixa el que veus a 100x			

Microorganisme			
Morfologia			
Organització de les cèl.lules			

PRACTICA N° 3: MOTILITAT

PROTOCOL 1

Microorganisme	A	B	Control
Dibuixa el que veus a 100x			

Microorganisme	A	B	Control
Morfologia			
Moviment			

Amb les observacions realitzades, pots determinar quin tipus de flagel·lació presenten els microorganismes problema?

Quines tècniques pots utilitzar per la visualització de flagels?

PRÀCTICA N° 4: AÏLLAMENT DE MICROORGANISMES

PROTOCOL 1. Aïllament per dilució

Origen de la mostra: _____

Fes un esquema de la metodologia que has seguit:

Fes el càlcul de la concentració que hi havia a la mostra:

Expressa en la següent taula les observacions i els resultats que has obtingut:

Microorganisme	Descripció de la colònia	n° de colònies	cfu/ml

PROTOCOL 2. Aïllament per esgotament en placa

Origen de la mostra: _____

Fes un esquema de la metodologia que has seguit:

Medi LB

Microorganisme	Creixement (+/-) i aspecte de les colònies		Gram
	24 h	48 h	

Medi McConkey

Microorganisme	Creixement (+/-) i aspecte de les colònies		Gram
	24 h	48 h	

Medi Manitol Salt

Microorganisme	Creixement (+/-) i aspecte de les colònies		Gram
	24 h	48 h	

Dels tres medis utilitzats quins són selectius i quins són diferencials? Per què? Quina informació et donen sobre els bacteris que hi creixen?

a

a

a

5	6	7	8
ORIGEN	ORIGEN	ORIGEN	ORIGEN
Augments	Augments	Augments	Augments
Tinció	Tinció	Tinció	Tinció
Microorganisme	Microorganisme	Microorganisme	Microorganisme

9	10	11	12
ORIGEN	ORIGEN	ORIGEN	ORIGEN
Augments	Augments	Augments	Augments
Tinció	Tinció	Tinció	Tinció
Microorganisme	Microorganisme	Microorganisme	Microorganisme

995
8

PROTOCOL 2.

Dibuixa el que veus, indicant l'origen de la mostra, els augments en què es fa l'observació, la tinció que hakis realitzat i quin tipus de microorganisme has observat.

1	2	3	4
ORIGEN	ORIGEN	ORIGEN	ORIGEN
Augments	Augments	Augments	Augments
Tinció	Tinció	Tinció	Tinció
Microorganisme	Microorganisme	Microorganisme	Microorganisme

5	6	7	8
ORIGEN	ORIGEN	ORIGEN	ORIGEN
Augments	Augments	Augments	Augments
Tinció	Tinció	Tinció	Tinció
Microorganisme	Microorganisme	Microorganisme	Microorganisme

9	10	11	12
ORIGEN	ORIGEN	ORIGEN	ORIGEN
Augments	Augments	Augments	Augments
Tinció	Tinció	Tinció	Tinció
Microorganisme	Microorganisme	Microorganisme	Microorganisme

13	14	15	16
ORIGEN	ORIGEN	ORIGEN	ORIGEN
Augments	Augments	Augments	Augments
Tinció	Tinció	Tinció	Tinció
Microorganisme	Microorganisme	Microorganisme	Microorganisme

PRÀCTICA N° 6: CORBA DE CREIXEMENT

Microorganisme utilitzat: _____

Medi de cultiu utilitzat: _____

Anota en la següent taula els resultats obtinguts:

Temps	Absorbància 450 nm

Fes un càlcul del temps de duplicació (T_d) i de la taxa específica de creixement (μ) del microorganisme en el medi de cultiu utilitzat:

Temps de duplicació (min)	
Taxa específica de creixement (h^{-1})	

Anota en la següent taula els resultats del altres grups de pràctiques

Medi de cultiu	Microorganisme	Td (min)	μ (h ⁻¹)

Hi ha diferències entre els temps de duplicació dels microorganismes segons els medis de cultiu utilitzats?

Hi ha diferències entre els diferents microorganismes?

NORMATIVA DE TREBALL AL LABORATORI DE MICROBIOLOGIA

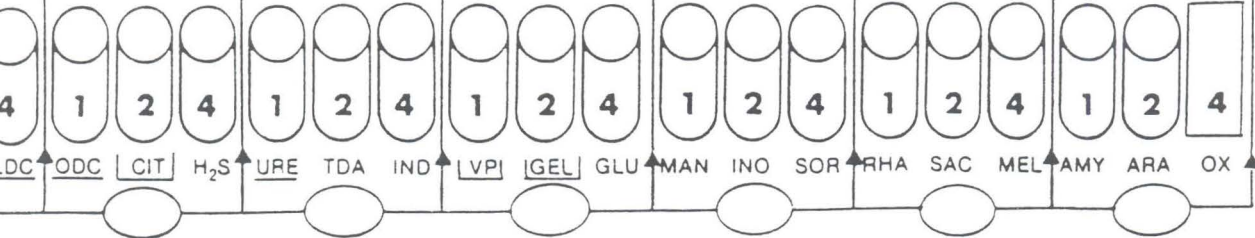
- Les pràctiques començaran puntualment. No s'admetrà l'alumne que injustificadament arribi 15 min més tard de l'hora d'inici de les pràctiques.
- No és permés menjar ni fumar al laboratori.
- No és permés sortir del laboratori sense causa justificada.
- Cada dia l'alumne al finalitzar el treball ha d'ordenar i netejar tot el material emprat.
- Durant el desenvolupament de les pràctiques s'han de respondre els qüestionaris corresponents.
- Al finalitzar cada part de pràctiques, l'alumne ha d'entregar al professor de pràctiques els qüestionaris corresponents
- En l'avaluació final de les pràctiques es tindrà en compte la valoració feta al laboratori sobre el rendiment i l'assistència de cada alumne i sobre les respostes als qüestionaris.

TABLA DE LECTURA

TESTS	SUBSTRATOS	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS	
			NEGATIVO	POSITIVO
ONPG	ortonitrofenol-galactosido	β -galactosidasa	incolore	amarillo (1)
ADH	arginina	arginina dehidrolasa	amarillo	rojo/ naranja (2)
LDC	lisina	lisina descarboxilasa	amarillo	naranja
ODC	ornitina	ornitina descarboxilasa	amarillo	rojo/ naranja (2)
CIT	citrato sódico	utilización del citrato	verde pálido/ amarillo	azul-verde/ verde (3)
H ₂ S	tiosulfato sódico	producción de H ₂ S	Incolore/ grisáceo	depósito negro
URE	urea	ureasa	amarillo	rojo/ naranja
TDA	triptófano	triptófano desaminasa	TDA / INMEDIATO	
			amarillo	marrón oscuro
IND	triptófano	producción del indol	JAMES / INMEDIATO o IND / 2 min	
			JAMES incolore verde claro/ amarillo	JAMES rosa
			IND amarillo	IND anillo rojo
VP	piruvato sódico	producción de acetoina	VP 1 más VP 2 / 10 minutos	
			incolore	rosado/ rojo
GEL	gelatina de Kohn	gelatinasa	no hay difusión de pigmento negro	difusión de pigmento negro
GLU	glucosa	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
MAN	manitol	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
INO	inosito	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
SOR	sorbitol	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
RHA	ramnosa	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
SAC	sacarosa	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
MEL	melibiosa	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
AMY	amigdalina	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
ARA	arabinosa	fermentación/ oxidación (4)	azul/ azul verdoso	amarillo
OX	sobre papel de filtro	citocromo oxidasa	OX / 1-2 minutos	
			incolore	violeta
NO ₃ NO ₂	tubo GLU	producción de NO ₂ reducción a gas N ₂	NIT 1 más NIT 2 / 2-3 minutos	
			amarillo	rojo
			Zn	
MOB	API M o microscopia	movilidad	rojo	amarillo
			inmovil	movil
MCC	medio Mac Conkey	crecimiento	ausencia	presencia
OF	glucosa (API OF)	cerrado fermentación abierto oxidación	verde verde	amarillo amarillo

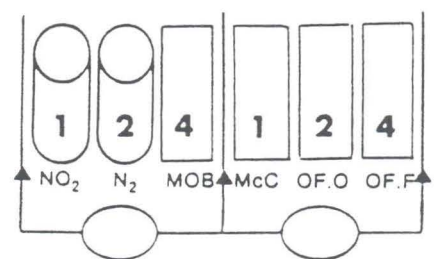
- 1) Un amarillo muy pálido debe considerarse como positivo
- 2) Un color naranja después de 24 H. de incubación debe considerarse negativo
- 3) La lectura debe hacerse en la cúpula (aerobiosis)
- 4) La fermentación empieza en la parte inferior de los tubos, la oxidación empieza en la cúpula.

995-
8

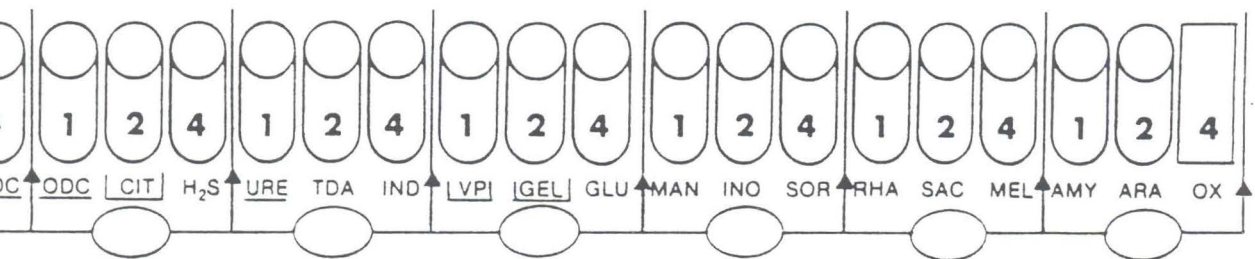


Identification :

REF.: Patient :
Date: Origine/Source :
Dr: Service/Dept :

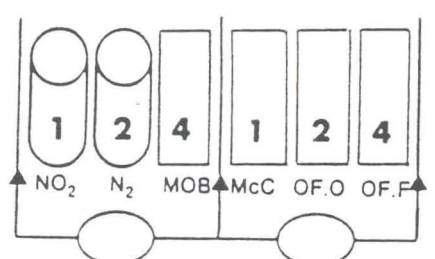


41 9005 B

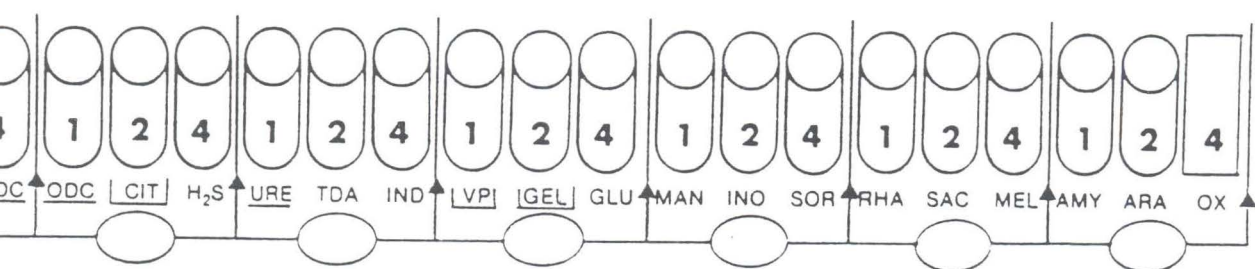


Identification :

REF.: Patient :
Date: Origine/Source :
Dr: Service/Dept :

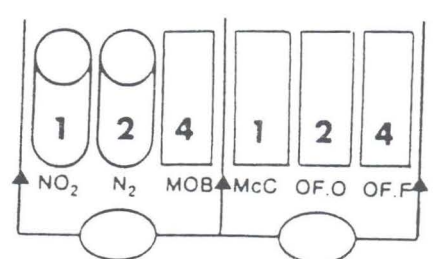


41 9005 B



Identification :

REF.: Patient :
Date: Origine/Source :
Dr: Service/Dept :



9005 B

a

a

a

L

S

C

:

D

S

I

:

I

:

I

: